

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian *true experimental* dengan menggunakan *post test only control group design*.

4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Malang dengan perkiraan waktu penelitian sekitar 1 bulan (8 Juni -5 Juli 2019).

4.3 Populasi dan Sampel Penelitian

4.3.1 Populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah bakteri *Propionibacterium acne* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Malang.

4.3.2 Sampel

Sampel dalam penelitian ini adalah *Propionibacterium acne* yang telah dibiakkan dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C yang disuspensikan dan dibandingkan dengan larutan Mac Farland 0,5 dengan kepadatan $1,5 \times 10^8$ sel/ml. Pengambilan sampel dengan menggunakan *Simple Random Sampling* yaitu pengambilan sampel secara acak sederhana.

4.3.3 Estimasi dan Jumlah Pengulangan

Penelitian menggunakan 7 kelompok perlakuan ekstrak teh putih dan 2 kelompok kontrol. Sehingga ada 9 kelompok. Berdasarkan rumus berikut P adalah jumlah perlakuan dan n adalah jumlah pengulangan, maka:

$$(P-1) (n-1) \geq 15$$

$$(9-1) (n-1) \geq 15$$

$$8 (n-1) \geq 15$$

$$8n - 8 \geq 15$$

$$n \geq 2,8 \approx 3$$

Dari perhitungan diatas, maka diperlukan 3 kali pengulangan.

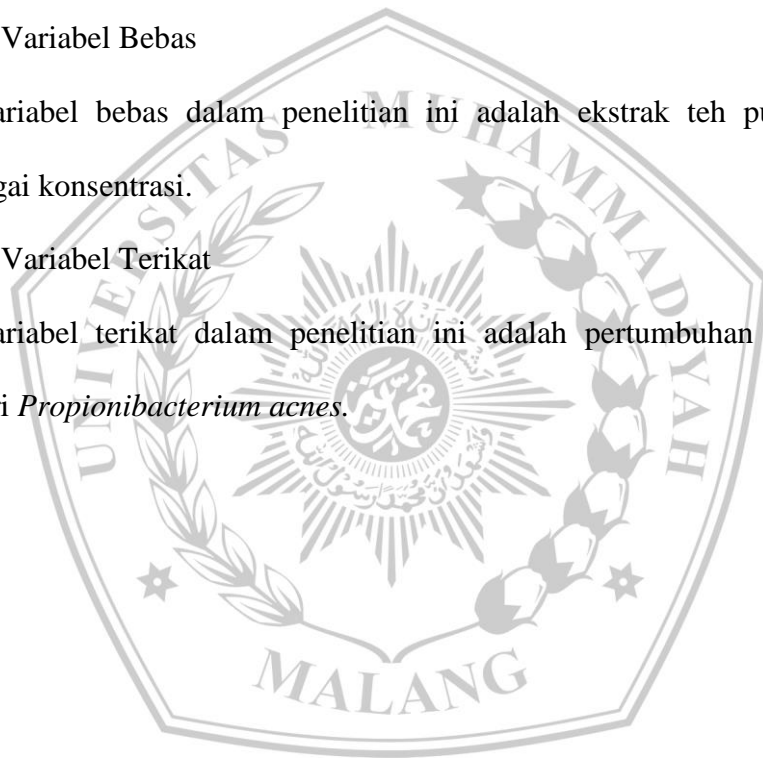
4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak teh putih dengan berbagai konsentrasi.

4.4.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah pertumbuhan dari koloni bakteri *Propionibacterium acnes*.



4.5 Definisi Operasional

Tabel 4.1 Definisi Operasional

No	Variabel	Definisi Operasional	Cara Pengukuran	Indikator Penilaian	Skala
Variabel Bebas					
1.	Ekstrak teh putih (<i>Camellia sinensis</i>)	Ekstrak teh putih yang digunakan dalam penelitian ini adalah teh putih kemasan yang dijual di pasaran yang diekstraksi dengan menggunakan metode maserasi dengan larutan etanol 70% . Kemudian dilakukan penyaringan untuk memisahkan bahan dari ampas, setelah itu bahan diuapkan dengan <i>rotatory evaporator</i> yang nanti akan menghasilkan ekstrak teh putih yang bebas dari pelarut etanol 70%.	a. Diekstraksi dengan etanol 70% b. Dimaserasi dengan etanol 70% c. Diuapkan dalam <i>rotatory evaporator</i> .	Konsentrasi: 1. 1% 2. 3% 3. 5% 4. 7% 5. 9% 6. 11% 7. 13%	Ordinal
Variabel Terikat					
2.	Pertumbuhan <i>Propionibacterium acnes</i>	Pertumbuhan bakteri dapat dilihat pada <i>nutrient agar</i> , kemudian kita lakukan perhitungan jumlah koloni bakteri.	Menggunakan metode KHM dan KBM	Kejernihan pada tabung uji dan jumlah koloni pada <i>Nutrient Agar</i>	
No	Variabel	Definisi	Cara	Indikator	Skala

	Operasional	Pengukuran	Penilaian	
KHM (Kadar Hambat Minimal)	Kadar minimal ekstrak teh putih (<i>Camellia sinensis</i>) yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri <i>Propionibacteriu m acnes</i> yang ditandai dengan jernihnya tabung coba	Diukur dengan melihat kejernihan tabung uji dan dibandingkan dengan kontrol bakteri.	Tabung uji jernih dengan terlihatnya tanda silang pada kertas. 1. Keruh bila x tidak terlihat 2. Jernih bila x terlihat	Nominal
KBM (Kadar Bunuh Minimal)	Kadar minimal ekstrak teh putih (<i>Camellia sinensis</i>) yang bisa membunuh bakteri ditandai dengan tidak munculnya bakteri yang berkembang pada <i>Nutient agar</i> .	Penghitungan dengan <i>Colony Counter</i> yang nantinya akan dibandingkan dengan kontrol bakteri.	Jumlah koloni pada <i>Nutrient Agar</i> yang berjumlah <0,1 % koloni bakteri	Rasio

4.6 Instrumen Penelitian

4.6.1 Alat dan Bahan Pembuatan *Nutrient Agar*.

1. Alat

Cawan petri, gelas berkala, pengaduk kaca, *microwave*

2. Bahan

Bubuk *nutrient agar*, aquadest

4.6.2 Alat dan Bahan Pembuatan *Nutrient Broth*.

1. Alat

Labu *Erlenmeyer*, pengaduk kaca

2. Bahan

Bubuk *nutrient broth*, aquadest

4.6.3 Alat dan Bahan Identifikasi *Propionibacterium acnes*.

1. Alat

Ose lengkung, mikroskop, minyak imersi, gelas objek, lampu spiritus

2. Bahan

Isolat bakteri *Propionibacterium acnes*, pewarna gram (Kristal violet, lugol, alcohol 96%, safranin)

4.6.4 Alat dan Bahan Uji Kepekaan Ekstrak Teh Putih.

1. Alat

Tabung reaksi steril, ose lengkung, pipet steril, inkubator, lampu spiritus, label, vortex, *colony counter*, kertas putih bergaris, inkubator.

2. Bahan

Perbenihan cair bakteri *Propionibacterium acnes*, ekstrak teh putih, *nutrient broth*, *nutrient agar*, disk blank (kertas cakram).

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Sterilisasi alat.

- a. Mencuci seluruh alat yang akan digunakan dengan sabun hingga bersih lalu dikeringkan
- b. Alat – alat yang dapat disterilisasi dengan autoklaf maka diletakkan di autoklaf pada suhu 121° dengan tekanan 15 atm selama 15 menit

4.7.2 Pembuatan Media *Nutrient Agar*.

Timbang bubuk *nutrient agar* sesuai yang dibutuhkan. Lalu masukkan ke tabung erlenmeyer. Tambahkan aquades lalu dipanaskan hingga mendidih. Kemudian disterilisasi ke dalam autoklaf dengan

suhu 121°C selama 20 – 25 menit. Tuangkan 20 ml ke cawan petri.

Kemudian dibiarkan dingin hingga suhu 50°C .

4.7.3 Pembuatan Media *Nutrient Broth*.

Timbang bubuk *nutrient broth* sesuai yang dibutuhkan. Lalu masukkan ke tabung Erlenmeyer. Tambahkan aquades tanpa dipanaskan. Kemudian diaduk hingga pepton dan *beef extract* larut sempurna. Kemudian disterilkan ke dalam autoklaf dengan suhu 121°C selama 20 – 25 menit.

4.7.4 Pembuatan Ekstrak Teh Putih

Ekstrak teh putih yang digunakan dalam penelitian ini adalah teh putih kemasan yang dijual di pasaran yang diekstraksi dengan menggunakan metode maserasi dengan larutan etanol 70% .

Kemudian dilakukan penyaringan untuk memisahkan bahan dari ampas, setelah itu bahan diuapkan dengan *rotatory evaporator* yang nanti akan menghasilkan ekstrak teh putih yang bebas dari pelarut etanol 70%.

4.7.5 Identifikasi Bakteri *Propionibacterium acnes*.

1. Pewarnaan Gram

Sampel bakteri *Propionibacterium acnes* diidentifikasi dengan pewarnaan gram.

Cara melakukan pewarnaan gram:

a. Siapkan ose, ose dipanaskan terlebih dahulu di api Bunsen.

Kemudian ambil aquades steril dan teteskan pada gelas objek. Lalu ambil kuman dengan ose yang telah dipanaskan dan letakkan pada

gelas objek kemudian suspensikan dengan aquades di gelas objek dan ratakan. Kemudian biarkan kering di udara. Lakukan fiksasi dengan melewati sediaan di atas api sebanyak 3 kali.

- b. Setelah difiksasi, tetesi sediaan dengan Kristal violet, tunggu selama 1 menit dan bilas dengan air.
- c. Teteskan lugol pada sediaan dan tunggu hingga 1 menit, buang sisanya dan bilas dengan air.
- d. Teteskan alkohol 96% pada sediaan cukup 5 – 10 detik atau sampai warna cat luntur kemudian buang sisa alkohol dan bilas dengan air.
- e. Teteskan safranin pada sediaan selama $\frac{1}{2}$ menit (30 detik) kemudian buang sisanya dan bilas dengan air.
- f. Keringkan dengan tissue lalu lihat dibawah mikroskop dengan lensa objektif perbesaran 100 kali (beri 1 tetes minyak imersi).
- g. Pada *Propionibacterium acne* hasilnya adalah gram positif berbentuk batang.

4.7.6 Pembuatan Suspensi Bakteri *Propionibacterium acnes*

Suspensi bakteri *Propionibacterium acnes* yang digunakan dalam penelitian ini adalah 10^6 bakteri/ml. Pembuatan suspensi bakteri tersebut distandarisasi dengan menggunakan McFarland 1 yaitu setara dengan kepadatan bakteri 10^8 bakteri/ml. Pembuatan suspensi bakteri dengan cara mengambil 4-10 ose bakteri dari *nutrient agar* lalu dimasukkan ke tabung yang diisi oleh aquades. Kemudian disetarakan kekeruhannya dengan larutan standar McFarland sehingga menjadi suspensi bakteri dengan kepadatan 10^8 bakteri/ml.

Kemudian mengambil 1 ml suspensi bakteri dengan kepadatan 10^8 bakteri/ml tersebut dan dimasukkan ke dalam tabung yang telah diisi 9 ml aquades sehingga kepadatan bakteri menjadi 10^7 bakteri/ml. Kemudian mengambil 1 ml dari suspensi bakteri dengan kepadatan 10^7 bakteri/ml dan dimasukkan ke dalam tabung yang berisi 9 ml *nutrient broth* sehingga kepadatan bakteri menjadi 10^6 bakteri/ml.

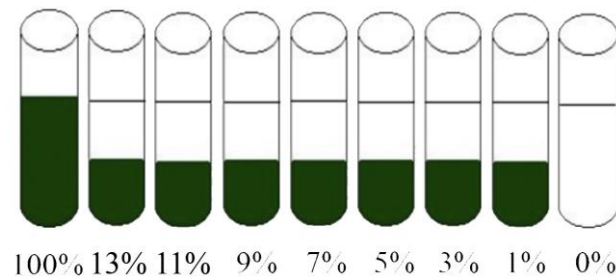
4.7.7 Uji Antibakteri Ekstrak Teh Putih terhadap *Propionibacterium acnes*.

Metode yang digunakan untuk tes ini adalah metode dilusi tabung dan metode difusi cakram. Pada penelitian ini diperlukan beberapa konsentrasi ekstrak teh putih untuk dicampurkan dengan perbenihan cair *Propionibacterium acnes* dengan cara berikut:

Metode Dilusi Tabung

Hari ke-1:

- a. Menyediakan 10 tabung reaksi steril; tabung 1, tabung 2, tabung 3, tabung 4, tabung 5, tabung 6, tabung 7. Masing-masing diberikan *Nutrient Broth* sebanyak 1 mL. Gunakan 2 tabung, tabung 1 digunakan untuk kontrol positif (*Propionibacterium acne* dan *Nutrient broth*) dan pada tabung 7 digunakan untuk kontrol negatif (*Propionibacterium acnes*). Masukkan bakteri sebanyak 1 mL pada tabung 2 sampai tabung 6.
- b. Dilakukan pencampuran akuades dengan ekstrak teh putih pada tabung 2 sampai 11, dengan konsentrasi sebagai berikut:



(Data primer,2019)

Gambar 4.1
Cara penelitian

Tabung 1: 100% → 2 ml ekstrak teh putih

Tabung 2: 9% → 0,18 ml ekstrak teh putih + 0,82ml akuades + 1 ml bakteri

Tabung 3: 7% → 0,14 ml ekstrak teh putih + 0,86 ml akuades + 1 ml bakteri

Tabung 4: 5% → 0,1 ml ekstrak teh putih + 0,9 ml akuades + 1 ml bakteri

Tabung 5: 3% → 0,06 ml ekstrak teh putih + 0,94 ml akuades + 1 ml bakteri

Tabung 6: 1% → 0,02 ml ekstrak teh putih + 0,98 ml akuades + 1 ml bakteri

Tabung 7: 0% → 1 ml akuades + 1 ml bakteri

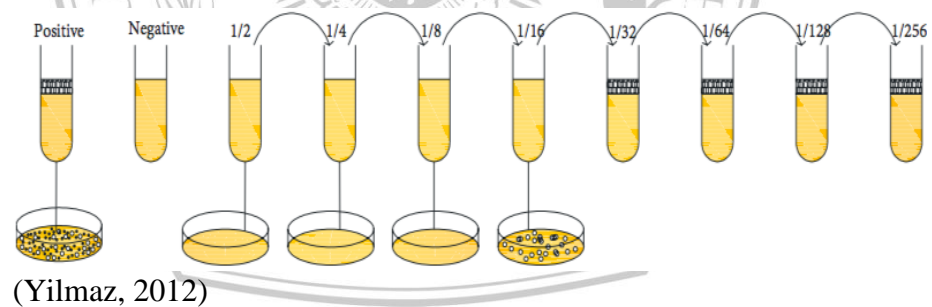
- c. Kemudian semua tabung diinkubasi ke dalam inkubator pada suhu 37°C selama 18-24 jam

Hari ke-2:

Pada hari ke-2 tabung dikeluarkan dari inkubator, dan lihat cairannya, tempelkan kertas yang sudah di beri tanda x pada bawah tabung. Bila cairan keruh (tanda x tidak terlihat) maka ada pertumbuhan bakteri (+) bila jernih (tanda x terlihat) tidak ada pertumbuhan bakteri (-). Lalu dari masing-masing tabung di ambil dengan 1 ose dan diinokulasikan pada *nutrient agar*, kemudian diinkubasikan lagi 18 – 24 jam dengan suhu 37⁰ C.

Hari ke-3:

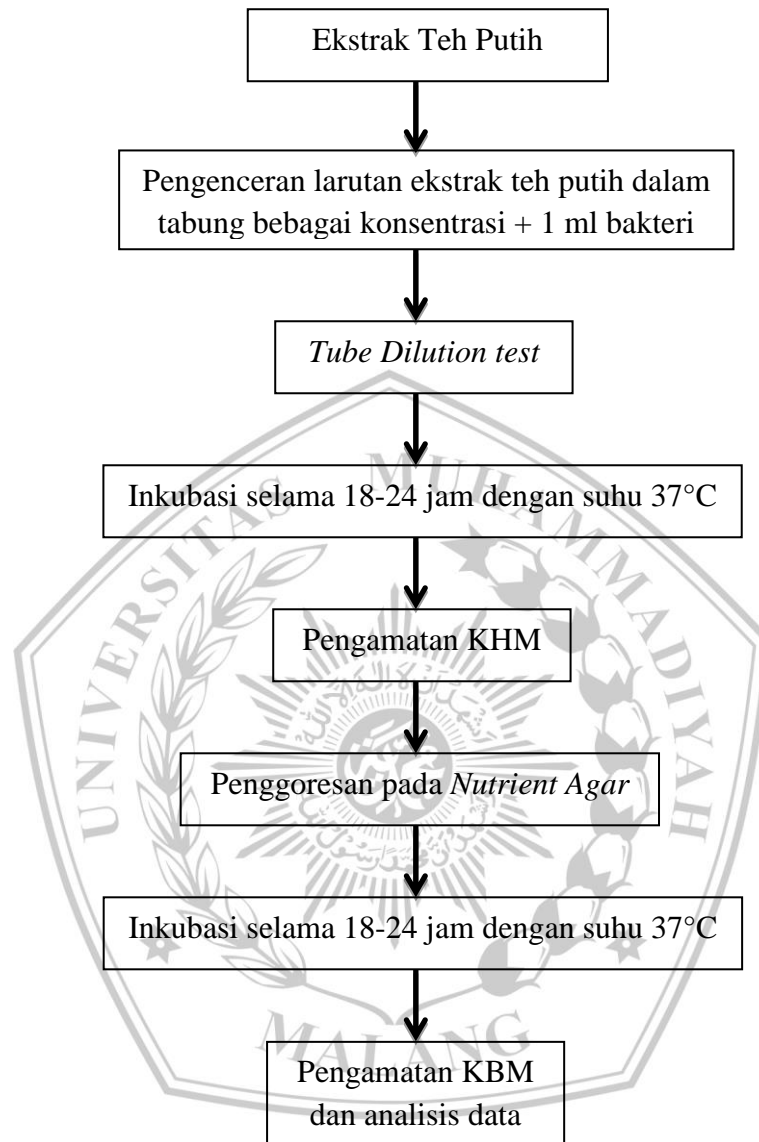
Pada hari ke-3, *nutrient agar* dikeluarkan dari inkubator. Kemudian dilakukan pengamatan dan penghitungan kuantitatif pada masing - masing konsentrasi dengan cara menghitung jumlah koloni bakteri dengan *colony counter* sehingga didapatkan data KBM.



Gambar 4.2
Penentuan KHM dan KBM

4.8 Skema alur penelitian

Penentuan KHM dan KBM



4.9 Analisis Data

Pada penelitian ini, data yang akan dianalisis yaitu jumlah koloni *Propionibacterium acnes* yang tumbuh pada *nutrient agar* berdasarkan tingkat konsentrasi ekstrak teh putih (*Camellia sinensis*). Analisis yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

1. Hasil penelitian KHM dan KBM pada beberapa jenis kelompok konsentrasi akan disajikan secara deskriptif.
2. Pada penelitian ini untuk mengetahui apakah kelompok data penelitian terdistribusi normal atau tidak normal dapat menggunakan uji normalitas *Saphiro – Wilk* (bila $n < 50$) atau menggunakan uji *Kormogorov Smirnov* (bila $n > 50$). Jika $p > 0,05$ maka distribusi data normal. Jika $p < 0,05$ maka distribusi data tidak normal sehingga dilakukan uji *Kruskal-Wallis*.
3. Data terdistribusi normal dapat dilanjutkan dengan uji homogenitas *Levene's Test* untuk mengetahui varian data penelitian homogen ($\text{sig} > 0,05$) atau tidak.
4. Apabila data homogen dapat dilakukan uji *one way ANOVA* dan *Post Hoc Bonferroni*. Jika varian data tidak homogen, maka dilakukan *Post Hoc Games – Howell* atau *Tamhane*. Melakukan Uji *one way ANOVA* ini bertujuan untuk membuktikan apakah ada perbedaan yang bermakna antara kelompok perlakuan.